

УДК 618.15-002:616-093-/098

DOI: 10.15587/2519-4798.2020.204094

## СТАН СИСТЕМИ ЦИТОКІНІВ ПРИ БАКТЕРІАЛЬНОМУ ДИСБІОЗІ ТА БАКТЕРІАЛЬНОМУ ВАГІНОЗІ

О. А. Грузевський

Взаємовідносини між умовно-патогенною мікрофлорою та антигенпрезентуючими клітинами слизової піхви реалізуються через утворення інтерлейкінів, які можуть визначати прогресію бактеріального дисбіозу та розвиток бактеріального вагінозу.

**Мета дослідження** – вивчити стан системи інтерлейкінів у крові та вагінальному секреті при бактеріальному дисбіозі різного ступеню та бактеріальному вагінозі.

**Матеріал і методи.** Залучені дані 298 жінок, які за індексом умовно-патогенної мікрофлори та показником нормобіоти були розподілені на групи: нормоценоз ( $n=53$ ), бактеріальний дисбіоз I ( $n=128$ ) і II ( $n=117$ ) ступеня. З групи жінок з дисбіозом II ступеню виокремлено 83 пацієнтки з бактеріальним вагінозом, який діагностували за показником нормобіоти (більший за 1lg генітальних еквівалентів/зразок). Зіскрібки епітелію з задньобочкової стінки піхви досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції, кількісно визначали факультативні і облигатні анаероби, міко- і уреоплазми та дріжджоподібні гриби. Методом імуноферментного аналізу у сироватці та вагінальному секреті визначали вміст інтерлейкінів. Для статистичного аналізу використовували програму Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA).

**Результати.** Вміст у крові інтерлейкінів  $1\beta$ , 2, 4, 6, 8, 10 і фактора некрозу пухлин- $\alpha$  збільшувався з поглибленням бактеріального дисбіозу та сягав максимуму при бактеріальному вагінозі: у 3,0–6,0 рази ( $p<0,001$ ) вище, ніж при нормоценозі. За приростом інтерлейкіни розподілилися: інтерлейкін  $1\beta$  > інтерлейкін-6 > інтерлейкін-8 > фактор некрозу пухлин- $\alpha$  > інтерлейкін-2; у вагінальному вмісті: інтерлейкін-6 > фактор некрозу пухлин- $\alpha$  > інтерлейкін- $1\beta$  > інтерлейкін-8 > інтерлейкін-2. При бактеріальному дисбіозі вміст у крові та вагінальному вмісті  $\gamma$ -інтерферону перевищував, а при вираженому бактеріальному дисбіозі та при бактеріальному вагінозі – був нижчий, ніж при нормоценозі. Вміст інтерлейкіну-4 та інтерлейкіну-10 з розвитком бактеріального дисбіозу знижувався як у крові, так і у вагінальному секреті. Вміст у крові трансформуючого фактора зросту- $1\beta$  був збільшеним у порівнянні з нормоценозом тільки при бактеріальному вагінозі, тоді як у вагінальному секреті вміст фактору був збільшеним як при бактеріальному дисбіозі, так і при бактеріальному вагінозі. Серед показників вмісту цитокінів у крові рівень інтерлейкіну- $1\beta$  мав зв'язок з індексом умовно-патогенної мікрофлори: його вміст більш 24,6 пг/мл вказував на бактеріальний дисбіоз-II, від 9,6 до 24,5 пг/мл – на бактеріальний дисбіоз-I, а при вмісті менш 9,6 пг/мл – на нормоценоз. У вагінальному секреті з розвитком бактеріального вагінозу мали супресивне значення трансформуючий фактор зросту- $1\beta$  і інтерлейкін-10.

**Висновки.** Отримані дані підтвердили визначальну роль системи цитокінів у прогресії бактеріального дисбіозу та розвитку бактеріального вагінозу. Вміст у крові прозапальних цитокінів збільшувався у міру поглиблення дисбіозу, та сягав максимуму при бактеріальному вагінозі. Вміст протизапальних цитокінів з прогресуванням дисбіозу знижувався як у крові, так і у вагінальному секреті

**Ключові слова:** бактеріальний вагіноз, бактеріальний дисбіоз, нормо ценоз, інтерлейкін  $1\beta$ , інтерлейкін-6, інтерлейкін-8, фактор некрозу пухлин- $\alpha$ , інтерлейкін-4, інтерлейкін-10, трансформуючий фактор зросту- $1\beta$

Copyright © 2020, O. Hruzevskyi.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

### 1. Вступ

Бактеріальний вагіноз (БВ), найбільш поширена генітальна інфекція у жінок репродуктивного віку, яка пов'язана з підвищеним ризиком інфекцій, що передаються статевим шляхом [1]. Розвитку БВ передують поступове прогресуюче порушення екосистеми піхви – бактеріальний дисбіоз, при якому захисні імунні механізми, у тому числі – локальний імунний захист перестає працювати, що й складає умови для колонізації умовно-патогенною мікрофлорою [2, 3].

Для БВ характерно зниження як системної, так і місцевої запальної відповіді [3, 4]. При цьому у вагінальному секреті виявляють збільшені рівні

прозапальних інтерлейкінів (IL- $1\alpha$  і IL- $1\beta$ ) [4], що корелює зі збільшенням кількості *Gardnerella vaginalis* і *Mycoplasma hominis* [5]. Саме *Gardnerella vaginalis* належить важлива роль у етіології БВ: ця анаеробна бактерія здатна знижувати цитокінутворючу функцію дендритних клітин слизової піхви, що призводить до атипової слабкої запальної відповіді [6].

БВ-асоційовані бактерії *Megasphaera elsdenii* і *Prevotella timonensis* індукують дозрівання дендритних клітин і підвищують рівні прозапальних цитокінів [7]. Крім того, важливий учасник БВ-асоційованої мікробіоти – *Prevotella timonensis* викликає розвиток імунної відповіді переважно по клітинному

типу, оскільки сприяє диференціюванню Т-хелперів 1 типу (Th1). Також *Prevotella* активує Toll-подібний рецептор 2 типу, що призводить до вироблення Th17-поляризованих цитокінів антигенпрезентуючими клітинами, включаючи IL-23 та IL-1 [8]. Крім того, *Prevotella* стимулює епітеліальні клітини до продукування IL-8, IL-6 і LARC (liver activation regulated chemokine) які активують рекрутування нейтрофілів.

Отже, саме патогенна БВ-асоційована мікрофлора здатна змінювати імунну відповідь шляхом впливу на цитокінпродукуючу функцію дендритних клітин. Показано, що генітальні антигенпрезентуючі клітини відчувують грамнегативні бактерії через активацію Toll-подібних рецепторів 4 типу та викликають запалення через сигнальний шлях NF- $\kappa$ B (nuclear factor – kappa B) і рекрутування лімфоцитів за рахунок продукції цитокінів [9].

Грунтуючись на оцінці місцевого імунітету, принципово можливим є створення молекулярно-генетичних та імунологічних панелей для діагностики БВ [10, 11]. Так, показано, що IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  і інтерферон- $\gamma$ -індукований білок, (IP-10 – Interferon-gamma induced Protein-10) є біомаркерами для виявлення БВ [12]. Скринінг-тест, що включає визначення цих цитокінів може використовуватися для виявлення жінок з бактеріальним дисбіозом.

З іншого боку показано, що IL-1 $\beta$ , IL-8 і IL-6 у фізіологічних концентраціях стимулюють зростання нормальної мікрофлори (*Lactobacillus spp.*) і пригнічують зростання і продукування біоплівки *Staphylococcus aureus* і кишковою паличкою [13]. У більш високих концентраціях, типових для БВ, ці цитокіни пригнічують нормальну мікрофлору і стимулюють зростання умовно-патогенних мікроорганізмів. При цьому, регуляторний цитокін – трансформуючий фактор зросту (TGF- $\beta$ 1) демонстрував стимулюючий вплив на вагінальні мікросімбіоти як при фізіологічних, так і при надмірних концентраціях.

Таким чином, складні взаємовідносини між умовно патогенною мікрофлорою та антигенпрезентуючими клітинами реалізуються через здатність останніх до утворення прозапальних та регуляторних цитокінів, що може викликати прогресію бактеріального дисбіозу та розвиток БВ. Для розробки нових діагностичних підходів потрібно порівняння вмісту у крові та вагінальному секреті прозапальних та регулюючих цитокінів при бактеріальному дисбіозі різного ступеню та БВ.

**Мета дослідження** – вивчити вміст інтерлейкінів у крові та бактеріальному секреті при бактеріальному дисбіозі різного ступеню та БВ.

## 2. Матеріали та методи

В дослідженні використано результати обстеження 298 жінок у віці від 16 до 64 років (середній вік 40,0 $\pm$ 24,0 р.), які звернулися до гінеколога для профілактичного огляду або з приводу скарг на дискомфорт в області геніталій. Критерієм виключення була наявність у зіскрібках епітелію піхви безумовно патогенних мікроорганізмів (*Trichomonas vaginalis*,

*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* та *Herpes Simplex Virus 1,2*). Присутність у вагінальних мазках більш ніж 15–20 лейкоцитів в полі зору, що вказувало на наявність запальної реакції, також було критерієм виключення. Обстеження проводили на 21-й день менструального циклу.

Виконання досліджень схвалено рішенням Комісії з питань біоетики Одеського національного медичного університету (№ IRB 00004535 Odessa Ste Med U IRB#1) № 90Д від 27.11.2015. Вказані дослідження виконані відповідно до Кодексу етики Всесвітньої медичної асоціації (Декларація Гельсінкі). Дослідження проводили на базі Університетської клініки Одеського Національного медичного університету.

Під час огляду проводили взяття зіскрібка епітелію з задньобочкової стінки піхви за допомогою урогенітального зонда. Молекулярно-генетичні дослідження проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ДНК виділяли за допомогою набору реактивів «Проба-ГС» (ТОВ «ДНК-технологія», РФ). Ампліфікацію пробірок з реакційною сумішшю проводили в ампліфікаторі «DTLite» (ТОВ «ДНК-технологія», РФ). Для дослідження стану біоценозу піхви використовували тест-систему «Фемофлор 16», яка призначена для проведення ПЛР в режимі реального часу. Мікробіоту кількісно оцінювати за такими показниками: загальна бактеріальна маса (ЗБМ), нормобіота (*Lactobacillus spp.*), облигатні анаероби (*Atopobium vaginalis*, *Eubacterium spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Porphyromonas spp.*, *Lachnobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Megasphaera spp.*, *Veillonella spp.*, *Dialister spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Sneathia spp.*, *Leptotrichia spp.*, *Fusobacterium spp.*), факультативні анаероби (*Enterobacteriaceae spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*), мікоплазми (*Ureaplasma urealyticum* + *parvum*, *Mycoplasma hominis* + *genitalium*) і дріжджоподібних грибів (*Candida spp.*) [14].

Критерієм для розподілу пацієнток на групи був обраний індекс умовно-патогенної мікрофлори (ІУПМ), який розраховували, як різницю між сумою всіх умовно-патогенних мікроорганізмів і кількістю лактобактерій (в lg GE/зразок). При нормоценозі ІУПМ був нижчим від –3 lg GE/зразок (1-а група; n=53), при дисбіозі I ступеня ІУПМ був у діапазоні від –3 до –1 lg GE/зразок (2-а група; n=128) і при дисбіозі II ступеню ІУПМ був більше –1 lg GE/зразок (3-я група; n=117) [15]. Групи з дисбіозом розподіляли на підгрупи за показником нормобіоти (ПНБ), який розраховували як різницю між ЗБМ і кількістю лактобактерій (в lg GE/зразок). У 2-й групі виділено три підгрупи: 1-а – з ПНБ $\leq$ 0,3 lg GE/зразок (n=23), 2-а – з ПНБ від 0,3 до 1,0 lg GE/зразок (n=83) і 3-я – з ПНБ>1 lg GE/зразок (n=22). У 3-й групі виділено дві підгрупи: 1-а – з ПНБ $\leq$ 1 lg GE/зразок (n=34) і 2-а – з ПНБ>1 lg GE/зразок (n=83). В останній підгрупі ступінь дисбіозу був максимальним та відповідав стану БВ [16].

У всіх пацієнток здійснювали забір крові натще з кубітальної вени в кількості 3–4 мл. Пробірки

з кров'ю центрифугували для отримання сироватки. За допомогою стерильної ложки Фолькмана з склепін піхви збирали вагінальний секрет, обсяг якого складав 180–300 мкл. Аліквоту секрету доводили до 1000 мкл фізіологічним розчином. Фактор розведення враховували для кожного випадку і використовували при розрахунку результатів вимірювань як фактор корекції. Вміст інтерлейкінів 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), 2 (IL2), 4 (IL4), 6 (IL6), 8 (IL8), 10 (IL10), фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) та  $\gamma$ -інтерферону ( $\gamma$ -INF) в крові і вагінальному секреті проводили методом імуноферментному аналізу з використанням тест-систем виробництва ТОВ «Вектор-Бест» (РФ). Вміст трансформуючого фактора росту 1 $\beta$  (TGF-1 $\beta$ ) визначали з використанням тест-системи виробництва «DRG» (США).

Для описової статистики даних використовували середнє арифметичне (М) і помилку середньої (m). Парні незалежні вибірки даних порівнювали за критерієм Манна-Уїтні (U). Значимість всіх відмінностей приймали при  $p < 0,05$ . Для математичної обробки даних використовували кореляційний (визначення коефіцієнту рангової кореляції Спірмена) та регресійний аналіз із застосуванням пакету програм Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA).

### 3. Результати дослідження

Для з'ясування ролі прозапальних інтерлейкінів, як регуляторів функції імунної системи, було визначено їх вміст у крові (табл. 1) та порівняння таких даних з результатами, отриманими при вивченні вагінального секрету (табл. 2).

При порівнянні підгруп, що було виділено, встановлена відповідність збільшення рівню у крові прозапальних інтерлейкінів ступеню дисбіозу. Максимальних значень вміст цитокінів сягав при БВ: у 3,0–6,0 рази ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з рівнем при нор-

моценозі. Порівняння за ступенем приросту показало, що максимальною мірою був збільшений вміст у крові цитокінів IL1 $\beta$  і IL6, меншою мірою – IL8, TNF $\alpha$  і IL2.

Як видно з рис. 1, за ступенем приросту вмісту у крові, прозапальні інтерлейкіни розподілилися таким чином: IL1 $\beta$  > IL6 > IL8 > TNF $\alpha$  > IL2.

Вже на легку ступень дисбіозу (1-а підгрупа 2-ої групи) відповіли такі цитокіни: IL1 $\beta$  > IL6 > TNF $\alpha$  (за ступенем приросту у порівнянні з нормоценозом; рис. 1). Найбільша їх реактивність підтверджує їх роль як негайних факторів, регулюючих імунне запалення – цитокіни «першого каскаду» [17]. Зростання вмісту й інших інтерлейкінів вказує на те, що й вони приймали участь у імунній відповіді, що сприяло подовженню та розширенню запалення й рекрутуванню у вогнище імунокомпетентних клітин та залученню ендокринної та інших систем організму до запалення [17].

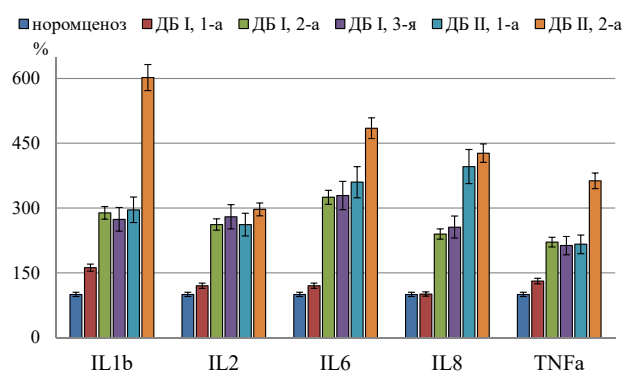


Рис. 1. Порівняльний вміст прозапальних цитокінів (у % до рівня при нормоценозі, який прийнято за 100 %) у крові залежно від ступеня дисбіозу; ДБ I – дисбіоз I ступеню, ДБ II – дисбіоз II ступеню; 1-а, 2-а, 3-я – підгрупи; статистичну значущість різниць наведено в табл. 1

Таблиця 1

Показники вмісту прозапальних цитокінів у крові (М±m)

Група, підгрупа		IL1 $\beta$ , пг/мл	IL2, пг/мл	IL6, пг/мл	IL8, пг/мл	TNF $\alpha$ , пг/мл
1-а група (нормоценоз), n=53		6,57±0,25	6,05±0,25	8,42±0,42	7,68±0,30	14,64±0,46
2-а група (дисбіоз I ступеня), n=128	1-а підгрупа, n=23	10,65±0,66	7,26±0,59	10,14±0,33	7,74±0,67	18,92±0,73
	2-а підгрупа, n=83	18,98±0,41	15,84±0,28	27,36±0,46	18,40±0,32	31,89±0,59
	3-я підгрупа, n=22	17,98±0,92	16,96±0,62	27,71±0,81	19,66±0,79	30,76±1,22
3-я група (дисбіоз II ступеня), n=117	1-а підгрупа, n=34	19,42±0,57	15,83±0,43	30,33±0,75	30,39±0,85	31,29±0,87
	2-а підгрупа, n=83	39,52±0,85	17,97±0,33	40,81±0,77	32,83±0,66	52,62±0,86
Статистична процедура порівняння результатів						
p(MW) <sup>1</sup>		<0,001	0,080	0,006	0,701	<0,001
p(MW) <sup>2</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>3</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>4</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>5</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Примітка: вірогідність розбіжностей з використанням критерію Манна-Уїтні між відповідними показниками в 1-й групі та:  $p(MW)^1$  – в 1-й підгрупі 2-ї групи,  $p(MW)^2$  – в 2-й підгрупі 2-ї групи,  $p(MW)^3$  – в 3-й підгрупі 2-ї групи,  $p(MW)^4$  – в 1-й підгрупі 3-ї групи,  $p(MW)^5$  – в 2-й підгрупі 3-ї групи

У вагінальному секреті у міру поглиблення дисбіозу вміст прозапальних цитокінів також був синхронно та планомірно збільшеним у порівнянні з нормоценозом (табл. 2), та при БВ перевищував показник нормоценозу в 2,1–3,4 рази ( $p < 0,001$ ). За ступенем збільшення рівню вивчені інтерлейкіни розподілилися таким чином:  $IL6 > TNF\alpha > IL1\beta > IL8 > IL2$ . Першим на дисбіоз відреагував  $TNF\alpha$ , максимальний приріст продемонстрував  $IL6$ , а найбільш інертну реакцію –  $IL2$ . Хоча необхідно відзначити, що цей розподіл можна вважати умовним, оскільки всі прозапальні інтерлейкіни продемонстрували дружній приріст рівня та виражену реакцію на активацію умовно патогенної мікрофлори, що підтверджує положення про «ланцюговий каскад» інтерлейкінової реакції на тлі запалення.

Особливістю реакції інтерлейкінів у вагінальному секреті, на наш погляд, можна вважати дружній і паралельний приріст їх вмісту зі збільшенням ступеня дисбіозу. В цілому, такі дані збігалися з отриманими у крові, адже ж приріст рівня у крові виявився більш значущим (у 1,5–2 рази), ніж у вагінальному секреті. Отже, можна було заключити, що активація «інтелейкінового каскаду» мала як локальний, так і системний характер, причому останній виявився навіть більш значимим.

Також було проведено вивчення вмісту у крові регуляторних цитокінів (табл. 3). Вміст у крові  $\gamma$ -INF виявився підвищеним у 1,5 рази ( $p < 0,001$ ) у 2-й підгрупі 2-ої групи, тоді як при розвитку вираженого дисбіозу він виявився різко зниженим: у 1,6 рази у 1-й підгрупі 2-ої групи та у 2,7 рази у 2-й підгрупі 2-ої групи (при БВ);  $p < 0,001$  у всіх випадках у порівнянні з нормоценозом.

Такі порівняння наведені на рис. 2, з якого виходе, що її можна визнати двофазною: при дисбі-

озі мала місце активація синтезу  $\gamma$ -INF, тоді як при вираженому дисбіозі та при БВ – його пригнічення. Цей цитокін – активний прозапальний фактор, пов'язаний як з вродженим, так і з адаптивним імунітетом [17], який поряд з прозапальними цитокінами ( $IL1\beta$  і  $TNF\alpha$ ) залучає до запальної реакції Т-лімфоцити і моноцити. Його зменшення при дисбіозі II ступеню може пояснювати імунодефіцит, притаманний цьому стану.

Цікаво, що саме така тенденція була визначена і у вагінальному секреті (табл. 4): у 2-й підгрупі 2-ої групи вміст  $\gamma$ -INF був збільшеним у порівнянні з нормоценозом у 1,3 рази, а при БВ – зниженим у 4,6 рази ( $p < 0,001$  у обох випадках). Ці порівняння цілком відповідали таким у крові, що вказувало на повну залежність вмісту  $\gamma$ -INF у вагінальному секреті від такого у крові.

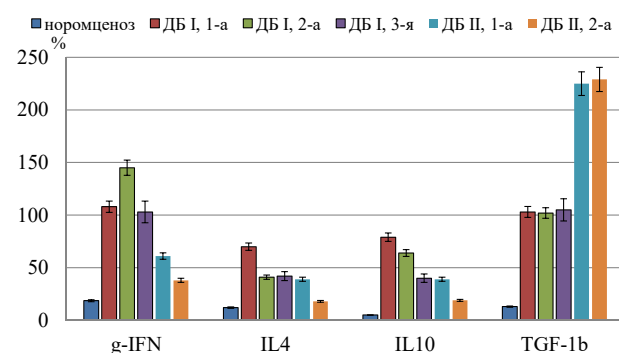


Рис. 2. Порівняльний вміст регуляторних цитокінів (у % до рівня при нормоценозі, який прийнято за 100 %) у крові залежно від ступеня дисбіозу; ДБ I – дисбіоз I ступеню, ДБ II – дисбіоз II ступеню; 1-а, 2-а, 3-я – підгрупи; статистичну значущість різниць наведено в табл. 3

Таблиця 2

Вміст прозапальних цитокінів у вагінальному секреті (M±m)

Група, підгрупа		IL1 $\beta$ , пг/мл	IL2, пг/мл	IL6, пг/мл	IL8, пг/мл	TNF $\alpha$ , пг/мл
1-а група (нормоценоз), n=53		18,4±0,6	19,2±0,8	12,4±0,5	39,0±1,2	19,5±0,4
2-а група (дисбіоз I ступеня), n=128	1-а підгрупа, n=23	20,1±0,06	18,5±1,4	12,6±0,6	40,3±2,1	28,3±0,9
	2-а підгрупа, n=83	26,3±0,4	21,3±0,4	25,0±0,3	69,5±1,3	35,0±0,7
	3-я підгрупа, n=22	37,6±1,2	39,3±1,3	28,3±1,1	78,1±3,0	37,5±1,6
3-я група (дисбіоз II ступеня), n=117	1-а підгрупа, n=34	41,4±1,0	40,5±1,1	40,8±1,0	87,0±2,9	36,8±1,2
	2-а підгрупа, n=83	51,1±0,9	40,5±0,8	42,4±0,9	94,0±1,7	58,4±1,1
Статистична процедура порівняння результатів						
p(MW) <sup>1</sup>		0,111	0,519	0,512	0,449	1,36E-09
p(MW) <sup>2</sup>		<0,001	0,025	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>3</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>4</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>5</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Примітка: вірогідність розбіжностей з використанням критерію Манна-Уїтні між відповідними показниками в 1-й групі та:  $p(MW)^1$  – в 1-й підгрупі 2-ї групи,  $p(MW)^2$  – в 2-й підгрупі 2-ї групи,  $p(MW)^3$  – в 3-й підгрупі 2-ї групи,  $p(MW)^4$  – в 1-й підгрупі 3-ї групи,  $p(MW)^5$  – в 2-й підгрупі 3-ї групи



Таблиця 3

## Показники вмісту регуляторних цитокінів у крові (M±m)

Група, підгрупа		γ-INF, пг/мл	IL4, пг/мл	IL10, пг/мл	TGF-1β, пг/мл
1-а група (нормоценоз), n=53		18,66±0,55	12,05±0,39	5,03±0,28	13,00±0,47
2-а група (дисбіоз I ступеня), n=128	1-а підгрупа, n=23	20,07±1,15	8,46±0,22	3,98±0,11	13,38±0,41
	2-а підгрупа, n=83	27,08±0,54	4,98±0,07	3,21±0,07	13,24±0,24
	3-я підгрупа, n=22	19,29±0,59	5,01±0,18	1,99±0,05	13,61±0,48
3-я група (дисбіоз II ступеня), n=117	1-а підгрупа, n=34	11,36±0,35	4,64±0,12	1,97±0,05	29,20±0,79
	2-а підгрупа, n=83	7,03±0,12	2,20±0,04	0,98±0,02	29,77±0,56
Статистична процедура порівняння результатів					
p(MW) <sup>1</sup>		0,116	<0,001	0,014	0,527
p(MW) <sup>2</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	0,633
p(MW) <sup>3</sup>		0,425	<0,001	<0,001	0,386
p(MW) <sup>4</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>5</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Примітка: вірогідність розбіжностей з використанням критерію Манна-Уїтні між відповідними показниками в 1-й групі та: p(MW)<sup>1</sup> – в 1-й підгрупі 2-ї групи, p(MW)<sup>2</sup> – в 2-й підгрупі 2-ї групи, p(MW)<sup>3</sup> – в 3-й підгрупі 2-ї групи, p(MW)<sup>4</sup> – в 1-й підгрупі 3-ї групи, p(MW)<sup>5</sup> – в 2-й підгрупі 3-ї групи

Таблиця 4

## Вміст регуляторних цитокінів у вагінальному секреті (M±m)

Група, підгрупа		γ-INF, пг/мл	IL4, пг/мл	IL10, пг/мл	TGF-1β, пг/мл
1-а група (нормоценоз), n=53		1,87±0,06	26,8±0,9	11,44±0,40	37,8±1,1
2-а група (дисбіоз I ступеня), n=128	1-а підгрупа, n=23	1,93±0,05	29,1±0,7	7,85±0,29	35,5±2,2
	2-а підгрупа, n=83	2,47±0,04	18,9±0,3	6,28±0,11	45,5±0,9
	3-я підгрупа, n=22	0,84±0,03	12,5±0,4	3,16±0,10	48,4±1,6
3-я група (дисбіоз II ступеня), n=117	1-а підгрупа, n=34	0,71±0,02	12,4±0,3	3,00±0,08	92,3±2,4
	2-а підгрупа, n=83	0,41±0,01	5,9±0,1	2,81±0,05	94,7±1,0
Статистична процедура порівняння результатів					
p(MW) <sup>1</sup>		0,415	0,032	1,01E-07	0,371
p(MW) <sup>2</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>3</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>4</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p(MW) <sup>5</sup>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Примітка: вірогідність розбіжностей з використанням критерію Манна-Уїтні між відповідними показниками в 1-й групі та: p(MW)<sup>1</sup> – в 1-й підгрупі 2-ї групи, p(MW)<sup>2</sup> – в 2-й підгрупі 2-ї групи, p(MW)<sup>3</sup> – в 3-й підгрупі 2-ї групи, p(MW)<sup>4</sup> – в 1-й підгрупі 3-ї групи, p(MW)<sup>5</sup> – в 2-й підгрупі 3-ї групи

## 4. Обговорення результатів дослідження

Реакція вмісту протизапальних інтерлейкінів IL4 та IL10 подібною у крові та вагінальному секреті (табл. 3, 4). Їх рівні знижувалися по підгрупах відповідно до стадії дисбіозу, що максимальною мірою було виражене при БВ: у 5,5 та 5,1 рази, відповідно, у крові та у 4,5 і 4,1 рази у вагінальному секреті (p<0,001 у всіх перелічених випадках у порівнянні з нормоценозом). Отже рівень протизапальних інтерлейкінів, на противагу прозапальним, при розвитку БВ різко знижувався, що вказувало на прогресування запальних реакції та можливий перехід запалення на системний рівень.

Рівень TGF-1β у крові не відрізнявся за такий при нормоценозі у 2-й групі, тобто при дисбіозі I ступеню (табл. 3). При дисбіозі II ступеню у 1-й підгрупі та у 2-й підгрупі (при БВ) рівень TGF-1β був рівною мірою (у 2,2 рази для обох підгруп; p<0,001) підвищеним. У вагінальному секреті (табл. 4) з поглибленням дисбіозу зафіксовано подвійний ступінчастий підйом вмісту цього цитокіну порівняно з показником нормоценозу – в 1,2–1,3 рази в 2-й і 3-й підгрупах дисбіозу I ступеня та в 2,4–2,5 рази за дисбіозу II ступеня. Отже у даному випадку теж спостерігалася подібна динаміка зміни вмісту TGF-1β у вагінальному секреті та у крові, адже ж реакція на дисбіоз у вагі-

нальному секреті спостерігалася швидше, тобто вже при дисбіозі I ступеню.

Розглядаючи найбільш виражені кількісні зсуви, можна відмітити, що максимальний приріст був характерний по вмісту у крові при БВ для IL1 $\beta$  і IL6 (у 6,0 та 4,8 рази), а у вагінальному секреті – для IL6 і TNF $\alpha$  (у 3,4 та 3,0 рази). Виражене зменшення вмісту було відмічено для протизапальних цитокінів (IL4 і IL10) у 5,1–5,5 рази у крові, та у 4,1–4,5 рази у вагінальному секреті. Отже ці показники можна вважати кандидатами для прогнозування БВ.

Згідно до результатів дискримінантного аналізу найбільш визначальними параметрами у розподілі пацієнток на групи були вміст у крові IL8, IL6, IL1 $\beta$  та TNF $\alpha$  (критерій F склав від 14,2 до 15,7;  $p < 0,001$ ). За цими показниками було проведено регресійний аналіз [18], який показав прямий вплив вмісту у крові IL1 $\beta$  на інтегральний показник мікробіоти – IУПМ, тобто саме IL1 $\beta$  міг доказово відображати тяжкість дисбіозу та розвиток БВ ( $\beta$ -коефіцієнт склав +0,345;  $p = 0,020$ ). Класифікаційний аналіз, проведений за допомогою побудови деревовидної структури показав, що усі пацієнтки, які мали в крові вміст IL1 $\beta$  більше 24,6 пг/мл мали дисбіоз II ступеню з імовірністю 92,3 %. При вмісті IL1 $\beta$  в крові від 9,6 пг/мл до 24,5 пг/мл пацієнтки відносилися до дисбіозу I ступеню з імовірністю 76,2 %, а при вмісті IL1 $\beta$  до 9,6 пг/мл у пацієнток був нормоценоз з імовірністю 81,2 %.

Згідно до результатів дискримінантного аналізу найбільш визначальними параметрами у розподілі пацієнток на групи по вмісту у вагінальному секреті були TGF-1 $\beta$  і IL10 (критерій F склав 57,4 і 53,6, відповідно;  $p < 0,001$ ). TGF-1 $\beta$  є одним із найбільше вивчених представників суперсімейства TGF. Його джерелом є багато клітин, насамперед активовані лейкоцити та регуляторні Т-лімфоцити, а функція полягає в аутокринному ефекті, тобто пригніченні секреції та відповідей на IL1, IL2,  $\gamma$ -INF, TNF $\alpha$  й інші прозапальні цитокіни [17]. Як показав проведений кореляційний аналіз, вміст TGF-1 $\beta$  у вагінальному секреті мав сильні прямі взаємозв'язки із вмістом усіх прозапальних інтерлейкінів (коефіцієнт кореляції  $r$  складав від 0,71 до 0,82). Також позитивний зв'язок вміст TGF-1 $\beta$  мав з IУПМ ( $r = 0,75$ ;  $p < 0,001$ ) і ПНБ ( $r = 0,51$ ;  $p < 0,001$ ), тоді як із ЗБМ і кількістю лактобактерій зв'язок був негативним ( $r = -0,54$  і  $r = -0,63$ , відповідно;  $p < 0,05$  в обох випадках).

На підставі цих результатів можна припустити, що TGF-1 $\beta$  виконував роль чинника, який пригнічував колоніальну резистентність вагінального секрету та, маючи імунорегуляторну активність, пригнічував імунну реакцію на тлі вагінального дисбіозу. Це припущення підтверджується наявністю негативно-го корелятивного зв'язку TGF-1 $\beta$  з  $\gamma$ -INF, IL4 та IL10 (значення  $r$  від  $-0,69$  до  $-0,81$ ;  $p < 0,05$  в усіх випадках). Серед умовно патогенної мікрофлори рівень TGF-1 $\beta$  був пов'язаний із вмістом облігатних анаеробів (значення  $r$  складало від 0,31 до 0,40;  $p < 0,05$  в усіх випадках). Такі результати збігалися з даними [13], в яких

було показано, що TGF-1 $\beta$  *in vitro* має стимулюючий вплив на умовно-патогенну мікрофлору піхви.

Майже таким, як у TGF-1 $\beta$ , критерій F був у IL10 ( $F = 53,6$ ;  $p < 0,001$ ). Цей протизапальний інтерлейкін продукується активованими моноцитами, макрофагами, Т-хелперами та є для цих клітин дуже сильним інгібітором. Так, відомо [17], що IL10 пригнічує утворення  $\gamma$ -INF, прозапальних цитокінів, експресію рецепторів TNF $\alpha$  та IL12. Як показали результати кореляційного аналізу, вміст IL10 у вагінальному секреті мав сильні прямі зв'язки з  $\gamma$ -INF ( $r = 0,80$ ;  $p < 0,05$ ), та зворотні – з усіма прозапальними інтерлейкінами (від  $r = -0,68$  до  $r = -0,77$ ;  $p < 0,05$  в усіх випадках). Позитивний зв'язок вміст IL10 мав із рівнем лактобактерій ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,001$ ) та ЗБМ ( $r = 0,41$ ;  $p < 0,001$ ), тоді як із ПНБ, вмістом факультативних та облігатних анаеробів зв'язок був негативним ( $r = -0,49$ ,  $r = -0,53$  і  $r = -0,47$  відповідно,  $p < 0,001$  в усіх випадках).

Отримані дані підтверджують роль TGF-1 $\beta$  і IL10 як універсальних та впливових супресивних факторів місцевого імунітету у ході розвитку БВ.

**Обмеження дослідження.** В дослідженні використано дані обстеження 298 жінок у віці від 16 до 64 років (середній вік  $40,0 \pm 24,0$  р.), які звернулися до гінеколога для профілактичного огляду або з приводу скарг на дискомфорт в області геніталій. Критерієм виключення була наявність у зіскрібках епітелію піхви безумовно патогенних мікроорганізмів (*Trichomonas vagina*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* та *Herpes Simplex Virus 1,2*). Присутність у вагінальних мазках більш ніж 15–20 лейкоцитів в полі зору, що вказувало на наявність запальної реакції, також було критерієм виключення.

**Перспективи подальших досліджень.** Дослідження, що їх було виконано, підтверджують визначну роль цитокінів у формуванні та прогресуванні бактеріального дисбіозу та БВ. Можна констатувати, що подальші дослідження рівнів цитокінів як на локальному та і на загальному рівні, їх співвідношень дозволить суттєво покращити діагностику подібних станів, а при розгляді у зв'язку з факторами специфічного і неспецифічного гуморального й клітинного імунітету може прокласти шлях до більш ефективної терапії і профілактики.

## 5. Висновки

1. Вміст у крові прозапальних цитокінів збільшувався у міру поглиблення ступеню дисбіозу, та сягав максимуму при БВ: у 3,0–6,0 рази ( $p < 0,001$ ) у порівнянні за рівень при нормоценозі. По ступеню приросту інтерлейкіни розподілилися таким чином: IL1 $\beta$  > IL6 > IL8 > TNF $\alpha$  > IL2. Вміст у вагінальному секреті також збільшувався, але меншою мірою, ніж у крові; за ступенем збільшення рівня вивчені інтерлейкіни розподілилися таким чином: IL6 > TNF $\alpha$  > IL1 $\beta$  > IL8 > IL2.

2. При бактеріальному дисбіозі вміст у крові та вагінальному секреті  $\gamma$ -INF перевищував, а при вираженому дисбіозі та при БВ – був зниженим у порівнянні з нормоценозом. Вміст протизапальних

цитокінів (IL4 та IL10) по мірі розвитку дисбіозу прогресуюче знижувався як у крові, так і у вагінальному секреті. Вміст у крові TGF-1 $\beta$  був збільшеним тільки при БВ, тоді як у вагінальному секреті – і при бактеріальному дисбіозі, і при БВ.

3. Встановлено, що серед показників вмісту цитокінів у крові рівень IL1 $\beta$  мав зв'язок з ІУПМ: його вміст більше 24,6 пг/мл вказував на дисбіоз II ступеню (ймовірність 92,3 %), від 9,6 до 24,5 пг/мл –

на дисбіоз I ступеню (ймовірність 76,2 %), а при вмісті менш 9,6 пг/мл – на нормоценоз (ймовірність 81,2 %). У вагінальному секреті серед всіх цитокінів в розвитку БВ мали супресивне значення TGF-1 $\beta$  та IL10.

#### Конфлікт інтересів

Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

#### Література

1. Nasioudis, D., Linhares, I., Ledger, W., Witkin, S. (2016). Bacterial vaginosis: a critical analysis of current knowledge. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 124 (1), 61–69. doi: <http://doi.org/10.1111/1471-0528.14209>
2. Coudray, M. S., Madhivanan, P. (2020). Bacterial vaginosis—A brief synopsis of the literature. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 245, 143–148. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.12.035>
3. Muzny, C. A., Taylor, C. M., Swords, W. E., Tamhane, A., Chattopadhyay, D., Cerca, N., Schwebke, J. R. (2019). An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 220 (9), 1399–1405. doi: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiz342>
4. Muzny, C. A., Schwebke, J. R. (2016). Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: Discussion of Current Hypotheses. *Journal of Infectious Diseases*, 214 (1), S1–S5. doi: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiw121>
5. Cox, C., Watt, A. P., McKenna, J. P., Coyle, P. V. (2016). *Mycoplasma hominis* and *Gardnerella vaginalis* display a significant synergistic relationship in bacterial vaginosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35 (3), 481–487. doi: <http://doi.org/10.1007/s10096-015-2564-x>
6. Bertran, T., Brachet, P., Varelle-Delarbre, M., Falenta, J., Dosgilbert, A., Vasson, M.-P. et al. (2016). Slight Pro-Inflammatory Immunomodulation Properties of Dendritic Cells by *Gardnerella vaginalis*: The “Invisible Man” of Bacterial Vaginosis? *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–13. doi: <http://doi.org/10.1155/2016/9747480>
7. Van Teijlingen, N. H., Helgers, L. C., Zijlstra - Willems, E. M., van Hamme, J. L., Ribeiro, C. M. S., Strijbis, K., Geijtenbeek, T. B. H. (2020). Vaginal dysbiosis associated-bacteria *Megasphaera elsdenii* and *Prevotella timonensis* induce immune activation via dendritic cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 138, 103085. doi: <http://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103085>
8. Larsen, J. M. (2017). The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 151 (4), 363–374. doi: <http://doi.org/10.1111/imm.12760>
9. Anahtar, M. N., Byrne, E. H., Doherty, K. E., Bowman, B. A., Yamamoto, H. S., Soumillon, M. et al. (2015). Cervicovaginal Bacteria Are a Major Modulator of Host Inflammatory Responses in the Female Genital Tract. *Immunity*, 42 (5), 965–976. doi: <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.019>
10. Hilbert, D. W., Smith, W. L., Paulish-Miller, T. E., Chadwick, S. G., Toner, G., Mordechai, E. et al. (2016). Utilization of molecular methods to identify prognostic markers for recurrent bacterial vaginosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86 (2), 231–242. doi: <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.003>
11. Onderdonk, A. B., Delaney, M. L., Fichorova, R. N. (2016). The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 29 (2), 223–238. doi: <http://doi.org/10.1128/cmr.00075-15>
12. Masson, L., Barnabas, S., Deese, J., Lennard, K., Dabee, S., Gamielien, H. et al. (2018). Inflammatory cytokine biomarkers of asymptomatic sexually transmitted infections and vaginal dysbiosis: a multicentre validation study. *Sexually Transmitted Infections*, 95 (1), 5–12. doi: <http://doi.org/10.1136/sextrans-2017-053506>
13. Kremleva, E. A., Sgibnev, A. V. (2016). Proinflammatory Cytokines as Regulators of Vaginal Microbiota. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 162 (1), 75–78. doi: <http://doi.org/10.1007/s10517-016-3549-1>
14. Липова, Е. В., Болдырева, М. Н., Трофимов, Д. Ю., Витвицкая, Ю. Г. (2009). Урогенитальные инфекции, обусловленные условно-патогенной биотой у женщин репродуктивного возраста (клинико-лабораторная диагностика). Москва, 30.
15. Грузевський, О. А., Владимірова, М. П. (2014). Результати комплексного бактеріологічного дослідження вмісту піхви за умов бактеріального вагінозу. *Досягнення біології та медицини*, 2, 54–57.
16. Грузевский, А. А. (2017). Колонизационная резистентность при вагинальном дисбиозе: состояние гуморального и клеточного звеньев. *Вестник морской медицины*, 4 (77), 103–107.
17. Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., Roitt, I. M. (2016). *Roitt's Essential Immunology*. Wiley-Blackwell, 576 p.
18. Гур'янов, Я. Г., Лях, Ю. Є., Парій, В. Д., Короткий, О. В., Чалий, О. В., Чалий, К. О., Цехмістер, Я. В. (2018). Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакеті EZR (R-STATISTICS). Київ: Вістка, 208.

Received date 22.01.2020

Accepted date 12.02.2020

Published date 31.05.2020

**Грузевський Олександр Анатолійович**, кандидат медичних наук, доцент, завідувач кафедри, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, Одеський національний медичний університет, пров. Валіховський, 2, м. Одеса, Україна, 65082  
E-mail: [gruzevskiy@ua.fm](mailto:gruzevskiy@ua.fm)